

Development of the Raman spectroscopic technique for in vivo applications in the eye

Citation for published version (APA):

Erckens, R. J. (2001). *Development of the Raman spectroscopic technique for in vivo applications in the eye*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Universiteit Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.20010705re>

Document status and date:

Published: 01/01/2001

DOI:

[10.26481/dis.20010705re](https://doi.org/10.26481/dis.20010705re)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Summary and Conclusions

The diagnosis of pathologic conditions in the eye requires the use of chemical and histological techniques. However, these techniques can only be performed *in vitro*, which makes invasive procedures necessary to obtain the desired material from the eye. Spectroscopy is a common used analytical technique to investigate molecules and tissues in the laboratory. Raman spectroscopy is an excellent technique to investigate biological materials in aqueous environments. In 1928, C.V. Raman discovered the phenomena that if monochromatic light interacts with matter, a small amount of the scattered light is shifted in wavelength. The Raman shifted light corresponds with the vibrational frequency of the molecular bond. Since the Raman effect is weak, only 10^{-6} to 10^{-8} photons are shifted, a strong monochromatic light source is mandatory. The discovery of the laser in 1960, initiated a tremendous increase in the use of Raman spectroscopy in general. However, a laser is a hazardous light source for the eye since the laser beam is focused by the eye to a small spot size on the retina. This can result in irreversible damage to the retina tissue. The Raman spectroscopic technique offers interesting analytical diagnostic modalities, though the technique requires the use of a potential hazardous light sources for the eye.

This thesis describes the development of the Raman spectroscopic technique into a useful tool for obtaining information on *in vivo* eye tissues. Since little was done to achieve this goal in the past, the start of the research was in the sample chamber of the spectrometer, next using a commercial probe, towards the final customized design of a safe probe that can be used on a human eye.

Chapter 1 gives an introduction on eye anatomy, physiology and encountered diseases or problems in the ophthalmology department. Furthermore an introduction on general spectroscopic techniques is provided, with an emphasis on Raman spectroscopy. Finally, the aim of the study is discussed.

Chapter 2 provides a general review on the use of the Raman spectroscopic technique in general, while a detailed discussion on the use of Raman spectroscopy for ophthalmic purposes is given. Most articles are *in vitro* applications determining the protein contents and protein conformation in lenses; and investigation of retina tissue and establish the critical steps in vision like isomerization and determining different chromophores.

Chapter 3 begins with a discussion on the investigation on aqueous samples *in vitro* obtained in the sample chamber of the spectrometer to test the system performance and characterize several important biomedical molecules. The results of these experiments, together with other findings in literature, encouraged proceeding with further exploration and pursuing this thesis.

Chapter 4 discusses the use of a commercial available Raman probe. Spectra were obtained from different solutions and excised corneas. The experiments performed, made clear that the light dose needed for a legible Raman spectrum was far too high for *in vivo* applications. These findings made clear that a new probe design was necessary to obtain a high light gathering power and the possibility of optical sectioning. Furthermore, dimensions and setup of the probe should allow for an easy and safe alignment procedure to the animal or human eye. The 'quest' for such a design leads eventually to the development of a confocal probe.

Chapter 5 discusses this confocal probe design in detail. Main features of the probe are: A working distance of about 12 mm, a high light gathering power with a diffraction limited

outstanding optical quality. This configuration allows enough space between cornea and lens to be tolerated by a patient. The integration depth in the tissue can be chosen by means of the diameter of the collecting fiber, i.e. a fiber of 50 μm would yield an integration depth of about 130 μm in the tissue. The cornea, aqueous humor, and lens could clearly be resolved. Axial scans with this probe show the Raman spectra in a in situ rabbit eye.

Chapter 6 shows that with the confocal probe it was feasible to study cornea hydration in the living cornea of the rabbit. The hydration ratio (water/protein or OH/CH ratio) provided the information on the hydration status, as well in physiological conditions as after dehydration the cornea with a dehydrating agent.

Chapter 7 shows the feasibility to study lens hydration in the living rabbit. Using the OH/CH ratio, the change in hydration in different parts of the lens can be observed. Due to enhancements in methods and techniques, the light dose could be reduced. The 25 mW laser power as used in chapter 5 in 1 s could be reduced to 1 mW on 0.1 s. This brings the Raman technique in the safe light dose region for use in the eye.

In chapter 8 and 9, the ultimate goal of this thesis is discussed, namely clinical relevant applications of the Raman technique in patients. This goal was reached by using a safe light dose of 95 μW , and a short data collection time of 1 s. The data collection was well tolerated by the patients and they didn't encounter any discomfort during or after the measurements.

Chapter 8 discusses the detection of intraocular silicone oil in the anterior chamber of the eye of a patient with an opaque cornea. It was feasible to detect minute silicone remnants in the anterior chamber of the living rabbit eye.

Chapter 9 discusses the determination of the type of implanted artificial intraocular lens in patients with the Raman technique.

Conclusions

To adapt the accurate and precise Raman spectroscopic technique to a tool for obtaining in vivo information without interfering with the integrity of the eye tissue, an optical probe with a high light gathering power and high optical quality turned out to be an indispensable part of the setup. Commercially available probes often lack both qualities. Therefore considerable effort has been made to come from commercially available industrial probes, to probes for use in patients. The restricted maximum permissible light dose on the retinal tissue, demand that the Raman shifted photons are collected with a high efficiency. This in combination with the requirement for an optical dissection technique for control of position in the intact eye, led to a confocal approach. It was possible to obtain in the living rabbit eye Raman data on the amount of cornea hydration, determination of silicone oil in the aqueous humor, and the amount of lens hydration. The validation of the confocal setup proved that Raman spectroscopy was useful in obtaining noninvasive information on molecular properties of intraocular structures in patients, which was the aim of this thesis. The clinical use of the current probe is limited but it is a first step towards further development of this noninvasive technique for ophthalmic use and hopefully establishing the diagnostic use in ophthalmic diseases.

Future

The ophthalmic Raman spectroscopic setup can be seen as a chain of which some links, such as the spectrometer and the light source, cannot be optimized much. Whereas other links, such as the type of Raman spectroscopy or the configuration of the optical probe, earns closer examination. The spectrometer in this study had a focal length of 0.5 m giving adequate resolution, while the power of the argon laser (5 W) exceeded by far the safe dose to be delivered in a short time. This high output was strongly decreased to obtain safe levels for intraocular use. However, other Raman spectroscopic techniques might improve the sensitivity and the accuracy considerably. The use of 2-wavelength excitation provides interest since in this way the contribution of fluorescence to the Raman signal can be minimized afterwards. In case of a specific substance with a marked Raman peak position, resonance Raman could be applied to increase the intensity of that specific Raman signal. The quantum efficiency of the current CCD detectors in the wavelength up to 700 nm is reaching the physical limits. Development of detectors with increased quantum efficiency at the near infrared could be of interest, though the Raman intensity is inversely dependent on the wavelength used for excitation. Consequently, this would imply that more laser power is used and/or longer integration times. For patient comfort, an integration of seconds is preferable. An advantage of the use of longer wavelengths is, that they pose a lesser harmful threat to the retina tissue. So there will always be the trade off between excitation source, detector and integration time. However, further refinement on probe design offers some interesting possibilities.

The confocal probe works in a noncontact fashion. Due to the index of refraction of the eye (tear film $n=1.37$) and the surrounding air ($n=1.00$), it is very difficult to probe across the anterior chamber of the eye. The probing beam will be diffracted towards the retina, unless an extreme position at the side of the eye is used. For this reason a probe design that eliminates the index of refraction mismatch by means of a contact lens approach could perform well. In ophthalmology the use of contact lenses for either diagnostic or therapeutic purposes is daily routine. So a modified probe design preferably at 90 degrees, could study aqueous humor contents allowing higher excitation energies without compromising the retina.

Several substances in the aqueous humor are of interest to investigate: For instance, phenylalanine is a molecule of importance since in the disease phenylketonurea, the elevated level could be detected and being able to measure the concentration could help in regulating the patients diet. Other substances of interest in the aqueous humor include lactate, urea, glucose, and amino acids. Also pharmacokinetics, transport and bioavailability of pharmacological substances could be studied. Ultimately, measurements throughout the vitreous cavity shall be of utmost value since the vitreous humor plays a key role in physiology and disease of the eye.

Another promising tool for application with Raman spectroscopy is a Multivariate Statistical Method to detect different chemical substances dissolved in the same sample (e.g. different solvents like glucose, lactate, urea, and amino acids in the aqueous humor). So Multivariate Statistical Methods can be utilized to extract the correct information if analysis has to be made of a large number of parameters for the object under investigation, and if

there is overlap of different Raman spectral features or if spectra are 'buried' in larger interfering structures.

Given the mentioned opportunities and the rapid development of new Raman techniques, it can be expected that Raman spectroscopy in the near future will play a significant role in helping the ophthalmologist to obtain the desired information of different eye tissues in a patient friendly modality.

Samenvatting en conclusies

Voor de diagnostiek van pathologische processen in het oog zijn chemische en histologische bepalingen van groot belang. Echter deze bepalingen kunnen alleen in vitro verricht worden, waarmee dus invasieve handelingen in het oog nodig zijn om het vereiste materiaal te verkrijgen. Een veel gebruikte laboratorium techniek is de spectroscopie. Voor de meting van biologische (waterhoudende) weefsels is Raman spectroscopie een nauwkeurige en betrouwbare techniek. Deze techniek werd door C.V. Raman ontwikkeld na zijn ontdekking in 1928 dat monochromatisch licht voor een (zeer) klein deel van kleur veranderd bij het passeren van een vloeistof. De kleurverschuiving die optreedt hangt af van de trillingstoestand van de moleculen waaruit de vloeistof bestaat en is zó karakteristiek, dat het Raman spectrum representatief is voor het betreffende molecuul. Omdat slechts ongeveer 10^{-6} tot 10^{-8} fotonen (lichtdeeltjes) een Raman verschuiving vertonen, is een sterke monochromatische lichtbron vereist. Sinds de ontdekking van de laser in 1960 kan hieraan goed voldaan worden. Voor het oog echter, is een laser een potentieel gevaarlijke lichtbron, omdat de evenwijdige bundel zich door het oog tot een klein spotje op het netvlies laat focuseren. Het oog werkt als een brandglas waarbij irreversibele schade aan het netvlies kan ontstaan. Zelfs laser pointers met een vermogen van enkele milliWatts worden als gevaarlijk beschouwd. Met de Raman spectroscopie beschikken we dus over een nauwkeurige techniek voor chemische diagnostiek maar tevens is het toepassen van deze techniek juist voor het oog potentieel buitengewoon riskant.

Het doel van dit onderzoek was dan ook om een methode te ontwikkelen om Raman spectroscopie in het levende oog toe te passen zonder dat het oog gevaar loopt. Bij de start van het proefschrift werd een praktisch onontgonnen onderzoeksgebied aangetroffen. Daarom werd de Raman techniek eerst getest in de monstercamer van een Raman spectrometer. Daarna werd met een commerciële Raman sensor ("probe") naar oplossingen in een cuvette gekeken. Tenslotte werd een opstelling gebouwd die het uiteindelijk mogelijk maakte om veilig in het menselijk oog te meten.

In **hoofdstuk 1** wordt een introductie gegeven in de anatomie, de fysiologie en de pathofysiologie van het oog en de diagnostische mogelijkheden en problemen in de oogheelkunde. Tevens wordt hier de spectroscopische techniek geïntroduceerd met speciale aandacht voor de Raman spectroscopie. Tenslotte wordt het doel van het onderzoek beschreven.

In **hoofdstuk 2** wordt een algemeen overzicht gepresenteerd over het gebruik van Raman spectroscopische technieken terwijl een zeer gedetailleerd overzicht wordt gegeven van de wetenschappelijke literatuur op het gebied van de toepassing van Raman spectroscopie in de oogheelkunde. Hierbij is gestreefd naar volledigheid in het citeren van de auteurs. Tevens worden op dit gebied enkele bijzondere octrooien genoemd. De meeste artikelen beschrijven in vitro toepassingen waarin de proteïnen en proteïne configuratie in lenzen aan bod komen. Ook retina weefsel is onderzocht alsmede de kritische biochemische stappen (op retinaal niveau) die een rol spelen bij het tot stand komen van de visuele impuls, zoals isomerisatie en de functies van de verschillende chromoforen.

Hoofdstuk 3 begint met het onderzoek van in vitro verkregen waterige oplossingen in de monstercamer van de spectrometer om de potentie van de Raman techniek betreffende het karakteriseren van verschillende biomedische moleculen die in de oogheelkunde relevant zijn te testen. Ook is onderzocht in hoeverre de natuurlijke fluorescentie, die de kwaliteit

van het Raman signaal sterk beïnvloed, kan worden onderdrukt door gebruik te maken van langere golflengten. De resultaten van deze experimenten, samen met de informatie uit de literatuur, motiveerden verder onderzoek.

In **hoofdstuk 4** worden de resultaten beschreven die bereikt kunnen worden met een commercieel beschikbare probe. Met deze probe werden spectra verkregen van verschillende oplossingen en van getrepaneerde corneas. Deze experimenten toonden duidelijk aan dat de hoeveelheid licht die nodig was om een betrouwbaar Raman spectrum te verkrijgen veel te hoog was voor in vivo toepassingen. Ook de ruimtelijke selectiviteit schoot aanzienlijk tekort. Dit leidde tot de conclusie dat een nieuw optisch ontwerp nodig was om een systeem te verkrijgen met een grote lichtsterkte en de mogelijkheid om optische coupes te maken. Additionele eisen aan de probe waren dat de afmetingen en de uitvoering een veilige en eenvoudige uitlijn procedure mogelijk maakten. Dit laatste is van eminent belang bij in vivo metingen.

De “zoektocht” voor dit ontwerp leidde uiteindelijk tot de ontwikkeling van een confocale probe.

In **hoofdstuk 5** wordt een gedetailleerde beschrijving van de confocale probe gegeven. De belangrijkste eigenschappen van de probe zijn dat deze een vrije werkafstand in lucht van 12 mm heeft en dat hij zeer lichtsterk is bij een hoge optische kwaliteit. De hoge optische kwaliteit is bereikt door een microscoop objectief met een lange werkafstand te nemen waarmee de probe buigingsbegrensd is. In het oog wordt de werkafstand door de brekingsindex van de weefsels nog wat vergroot waardoor het meten van de cornea, kamerwater en lens mogelijk wordt. De integratiediepte van het weefsel kan worden ingesteld door de keuze van de diameter van het confocaal geplaatste fiber. Een fiber van 50 μm bijvoorbeeld geeft een integratiediepte van 130 μm in het weefsel. Hierdoor kunnen cornea, kamerwater en lens duidelijk van elkaar worden onderscheiden. Axiale scans met deze probe tonen de respectievelijke Raman spectra zoals in situ verkregen in konijnenogen.

In **hoofdstuk 6** wordt getoond dat met deze nieuwe confocale probe een axiale hydratatie gradient in de cornea kan worden gemeten. Hiervoor zijn in vivo experimenten bij het konijn verricht. Ook is de (de-)hydratie met succes als functie van de tijd gemeten. Hiervoor werd gebruik gemaakt van de water/proteïne ofwel de OH/CH verhouding, zowel onder fysiologische omstandigheden als bij gebruik van een dehydrerende topicaal toegediende zalf.

In **hoofdstuk 7** is hydratatie onderzoek onder fysiologische omstandigheden in lenzen van konijnenogen verricht. Dankzij verbetering in de methoden en technieken kon worden begonnen met het verminderen van de stralingsbelasting. De nog in hoofdstuk 5 gebruikte 25 mW gedurende 1 s werd hier gereduceerd tot 1 mW gedurende 0,1 s. Hiermee is de techniek veilig geworden voor het oog.

In de laatste twee hoofdstukken 8 en 9 wordt het uiteindelijke doel van dit promotieonderzoek beschreven, namelijk de klinisch relevante toepassingen van de Raman techniek in patiënten. Hiertoe werd het vermogen van de laser gereduceerd tot 95 μW bij een registratietijd van 1 s. Door de grote openingshoek van de lichtbundel is de stralingsdichtheid op de retina laag genoeg om veilig te zijn.

In **hoofdstuk 8** wordt siliconenolie in het oog aangetoond bij een patiënt met een troebele cornea. Bij het levende konijn was het mogelijk om in de voorste oogkamer kleine olie belletjes aan te tonen.

En tenslotte wordt in **hoofdstuk 9** aan de hand van patiënten onderzoek aangetoond dat het

materiaal van geïmplanteerde lenzen betrouwbaar kan worden vastgesteld aan de hand van Raman spectra.

Conclusies

Teneinde de nauwkeurige en betrouwbare Raman spectroscopie om te bouwen tot een gereedschap om niet invasief en in vivo informatie over de oogweefsels, kamerwater en glasvocht te verkrijgen, is een confocaal optisch systeem ontwikkeld met een grote lichtsterkte en hoge optische kwaliteit. Dit element is bij het onderzoek een onmisbaar deel van de opstelling geworden.

Commercieel verkrijgbare systemen met een vergelijkbare functie zijn meestal veel lichtzwakker en missen de hier vereiste hoge optische nauwkeurigheid. Daarom is er een aanzienlijke inspanning verricht om de bestaande systemen te vervangen door een systeem dat uiteindelijk geschikt was voor gebruik in patiënten. De beperkte maximaal toegestane stralingsbelasting van de retina, vereiste dat de fotonen met Raman verschuiving met een hoge efficiency werden verzameld. Tevens was het noodzakelijk een optische dissectie techniek voor de ruimtelijke beheersing van het meten in de drie dimensionale ruimte in het oog toe te passen. De combinatie hoge verzamel efficiency van de fotonen met een optische dissectie techniek, leidde tot de confocale benadering. De validatie van de confocale opstelling bevestigde dat Raman spectroscopie geschikt is voor het verkrijgen van informatie over moleculaire eigenschappen van intraoculaire structuren in patiënten op een niet-invasieve wijze, hetgeen het doel was van dit proefschrift. Het klinisch gebruik van de nu ontwikkelde opstelling is beperkt, maar het is een eerste stap in de richting van verdere ontwikkeling van deze niet- invasieve techniek, niet alleen als diagnostisch hulpmiddel bij oogheelkundige pathologie, maar ook bij het onderzoeken van fysiologische processen in het oog.

Toekomst

De oogheelkundige Raman spectroscopische opstelling kan gezien worden als een keten waarin sommige schakels, zoals de lichtbron, slechts weinig kunnen worden verbeterd. Terwijl andere schakels, zoals de aard van de Raman spectroscopie, of de configuratie van de opstelling nader onderzoek rechtvaardigen. De spectrometer in dit onderzoek had een focale afstand van 0,5 m waarmee de vereiste resolutie werd verkregen. Vergroting van de spleet verlaagd de spectrale resolutie maar verhoogd de algemene gevoeligheid in de huidige opstelling. Wordt een fiber gebruikt die de ronde confocale spot omvormt tot een spleetvormig beeld, dan kan de hoge resolutie van de spectrometer behouden blijven. Het vermogen van de gebruikte argon laser (5 W) is veel hoger dan noodzakelijk. Dit hoog vermogen moest sterk worden gereduceerd om in het veilige gebied voor intraoculair gebruik te komen. Echter, andere Raman spectroscopische technieken dan de in dit onderzoek gebruikte techniek zouden de gevoeligheid en de nauwkeurigheid wel eens aanzienlijk kunnen verhogen. Het gebruik van twee golfenlengte excitatie is een interessante mogelijkheid omdat hiermee de bijdrage van fluorescentie aan het Raman signaal achteraf kan worden geminimaliseerd. Indien een specifieke stof een goed gedefinieerd Raman signaal geeft, kan reso-

nantie Raman worden toegepast om de intensiteit van dat specifieke signaal te vergroten. De quantum efficiency van de huidige CCD detectors in het zichtbaar gebied is niet ver van de fysische grens verwijderd. Ontwikkeling van detectoren met verhoogde quantum efficiency in het nabije infrarood kan van belang zijn hoewel de Raman intensiteit omgekeerd evenredig is met de vierde macht van de golflengte van het excitatielicht. Dus voor dit gebied zal dan meer laser vermogen en/of langere integratietijd noodzakelijk zijn. Voor het comfort van de patiënten is een integratietijd van seconden of korter aan te bevelen. Een voordeel van het gebruik van langere golflengten is, dat deze minder schadelijk zijn voor de retina. Er zal dus altijd een afweging moeten worden gemaakt tussen de gewenste golflengte van de excitatiebron, de gevoeligheid van de detector en de duur van de integratietijd.

De confocale opstelling werkt contactloos. Vanwege de vorm en de brekingsindex van het oog (overgang van $n=1$ naar $n=1.37$ bij de lucht - traanfilm scheiding) is het moeilijk om loodrecht op de optische as van het oog door het kamerwater te exciteren. De excitatiebundel zal richting retina worden afgebogen tenzij een extreme positie aan de zijkant van het oog wordt gehanteerd. Hiervoor zou een optisch element ontworpen kunnen worden dat de brekingsindex overgang lucht - traanfilm elimineert, bijvoorbeeld zoals een contactlens of contactglas. In de oogheelkunde is het gebruik hiervan zowel voor therapeutische als diagnostische doeleinden dagelijkse routine. Een op deze wijze gemodificeerd confocaal element dat in de buurt van 90° t.o.v. de optische as van het oog werkt zou geschikt zijn om het kamerwater te onderzoeken, zonodig met hoger excitatievermogen, zonder de retina te beschadigen.

Er zijn verschillende stoffen in het kamerwater interessant om te onderzoeken: bijvoorbeeld phenylalanine is een belangrijk molecuul daar in de ziekte phenylketonurie, de verhoogde spiegel kan worden gedetecteerd waarmee een dieet kan worden ingesteld om de gewenste concentratie te verkrijgen. Andere interessante stoffen in het kamerwater zijn lactaat, ureum, glucose en aminozuren. Ook de farmacokinetiek, het transport en de bio-beschikbaarheid van farmacologische stoffen kunnen dan worden bestudeerd.

Dieper in het oog is het glasvocht van groot diagnostisch belang daar dit waarschijnlijk een sleutelrol speelt in de pathofysiologie van retinale aandoeningen.

Een andere veelbelovende ontwikkeling in de signaal analyse van de Raman spectra is de Multivariabele Statistische Methode welke detectie van verschillende chemische substanties, die samen in het te onderzoeken substraat zijn opgelost, mogelijk maakt (bijvoorbeeld glucose, lactaat, ureum en aminozuren in kamerwater). Deze methode kan dus worden toegepast indien een aantal verscheidene parameters in de signalen aanwezig zijn, en een overlapping van verschillende Raman spectra moet worden ontrafeld of indien spectra zijn "begraven" onder interfererende structuren.

Gezien de vermelde mogelijkheden en de snelle ontwikkeling van nieuwe Raman technieken, kan het worden verwacht dat Raman spectroscopie in de nabije toekomst een significante rol kan spelen in het helpen van de oogarts om de verlangde informatie van verschillende oogstructuren te verkrijgen op een voor de patiënt minimaal belastende manier.